



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oftalmologia

Efeitos do congelamento nas propriedades biomecânicas da cápsula anterior do cristalino – estudo piloto

Miguel Souza e Silva



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Oftalmologia

Efeitos do congelamento nas propriedades biomecânicas da cápsula anterior do cristalino – estudo piloto

Miguel Souza e Silva

Orientado por:

Professora Doutora Filomena Ribeiro

Resumo

A descrição de um protocolo que permita comparar a elasticidade de amostras da cápsula anterior do cristalino, antes e após o congelamento, é o principal objetivo deste trabalho. Para o efeito, é apresentada uma revisão bibliográfica, bem como uma metodologia para a avaliação biomecânica das amostras capsulares, sendo a mesma validada através de um estudo-piloto. Ambas as amostras foram obtidas através de Capsulorréxis Circular Contínua em doentes submetidos a cirurgia de catarata. A amostra descongelada foi congelada a -80°C , enquanto a amostra fresca foi obtida no próprio dia da avaliação biomecânica das amostras. Tanto a amostra fresca (controlo), como a descongelada foram avaliadas, recorrendo-se a Microscopia de Força Atómica, para determinação do módulo de elasticidade de Young. Sendo comparáveis a estudos anteriores, os valores obtidos apontam, não só para a viabilidade da Microscopia de Força Atómica na avaliação da elasticidade de amostras capsulares, como também evidenciam uma diminuição de, aproximadamente, 14% no módulo de elasticidade de Young da amostra descongelada relativamente à fresca, possivelmente devido a um aumento da sua hidratação. Assim sendo, a metodologia descrita para congelamento da cápsula anterior do cristalino pode ser utilizada num estudo subsequente com uma amostra maior, que venha a validar a criopreservação como método de conservação desta estrutura para estudos biomecânicos subsequentes.

Palavras-chave: Cápsula anterior do cristalino; Congelamento; Microscopia de Força Atómica; Módulo de elasticidade de Young; Propriedades biomecânicas

Abstract

The description of a protocol that allows to compare the elasticity of anterior lens capsules, before and after freezing, is the main goal of this essay. In order to do so, a bibliographic revision will take place, as well as the methodology for the capsular samples biomechanics evaluation, which will be validated through a pilot-study. Both samples were obtained by Continuous Curvilinear Capsulorhexis. The unfrozen sample was frozen at -80°C , while the fresh one was collected at biomechanical evaluation's day. To do so, both fresh and unfrozen samples were evaluated, using Atomic Force Microscopy, to determine Young's elasticity modulus. When compared to earlier studies, the obtained data lead to the viability of using Atomic Force Microscopy to evaluate the capsular samples elasticity.

Moreover, this data suggests that not only Atomic Force Microscopy is an useful form of microscopy when evaluating the elasticity of capsular samples, but also the decrease of, approximately, 14% on the Young's elasticity modulus of the unfrozen sample, when comparing to the fresh one. Therefore, the proposed methodology for freezing the anterior lens capsule can be applied in a subsequent study, with a larger sample, to validate the cryopreservation as a conservation method for future biomechanics studies of this structure.

Key words: Anterior lens capsule; Freezing; Atomic Force Microscopy; Young's modulus; Biomechanical properties

Índice

1. Introdução	7
2. Revisão Bibliográfica.....	7
3. Metodologia.....	13
4. Estudo-Piloto.....	14
5. Agradecimentos	16
6. Bibliografia.....	17

Glossário

BSS – *Balanced Salt Solution*

CCC – Capsulorréxis Circular Contínua

CEC – Células epiteliais do cristalino

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EDTA – Ácido etilenodiamina tetra-acético

f_0 – frequência inicial do *cantilever*

k – Constante de Spring

MFA – Microscopia de Força Atômica

PEX - Pseudoexfoliação

SCC – Síndrome de Contração Capsular

1. Introdução

O saco capsular do cristalino, juntamente com as zónulas, assume um papel fulcral na fisiopatologia de certas complicações tardias da cirurgia mais realizada em Oftalmologia: a cirurgia de catarata com implante de lente intraocular. Mais especificamente, a subluxação espontânea tardia do complexo saco – lente intraocular, bem como o SCC estão associados a alterações das propriedades biomecânicas do saco capsular do cristalino ^{1,2}. Acredita-se que um melhor conhecimento dessas mesmas propriedades seja, em última análise, importante para uma melhor compreensão não só dessas complicações, bem como da fisiopatologia da presbiopia ³⁻⁵. Como tecido biológico, é expectável que o saco capsular do cristalino sofra degradação enzimática quando ex-vivo. No entanto, a preservação de tecidos biológicos é possível através do congelamento ⁶. É, portanto, relevante validar métodos para conservar, descongelar, para, posteriormente, avaliar propriedades biomecânicas (como o módulo de elasticidade de Young) desta estrutura – utilizando-se a MFA.

Inicialmente, uma breve revisão da literatura sobre a microestrutura do saco capsular do cristalino é apresentada. De seguida, são revistos os efeitos da técnica de congelamento em tecidos, de um modo mais geral, bem como da cápsula anterior do cristalino. É, ainda, apresentada uma revisão bibliográfica sobre o estudo das propriedades biomecânicas da cápsula anterior do cristalino. Finalmente, é proposto, e testado, através de um estudo-piloto, um protocolo que visa a avaliação dos efeitos do congelamento na elasticidade da cápsula anterior do cristalino, à nanoescala, recorrendo-se à MFA.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Microestrutura do saco capsular do cristalino

A cápsula do cristalino é uma membrana basal elástica, espessa, transparente, acelular e flexível, constituída por uma rede tridimensional de fibras de colagénio de tipo IV rodeadas por uma matriz de glicosaminoglicanos. Esta membrana basal envolve totalmente a substância (celular) do cristalino. As zónulas de Zinn inserem-se na região equatorial do saco capsular, provenientes da *pars plicata* do corpo ciliar (Figura 1).

A espessura do saco capsular é um parâmetro importante na avaliação das suas propriedades biomecânicas ^{7,8}. A energia de deformação do saco capsular (i.e. a energia acumulada após a aplicação de uma carga) varia diretamente com a sua espessura ^{9,10}. Por sua vez, esta é altamente heterogênea, variando com a idade, com diferentes regiões capsulares e, ainda, entre espécies ³. Em relação às variações na espessura do saco capsular com a idade, convém lembrar que estão relacionadas com os processos degenerativos do complexo saco-cristalino ¹¹. Acredita-se que a elevada espessura capsular se deva ao desequilíbrio entre formação e *turnover* de matriz extracelular do saco capsular do cristalino, favorecendo a formação de matriz capsular ¹². Este fenómeno explica também o aumento da espessura do saco capsular, ao longo da vida. No saco capsular humano, a cápsula é mais espessa anterior e posteriormente ao equador capsular, coincidindo com a região onde as fibras zonulares de Zinn se inserem e o local de maior atividade metabólica das células epiteliais do cristalino. Dessa zona de inserção, a cápsula vai-se tornando mais fina anterior e posteriormente ¹². Por outro lado, esta distribuição não uniforme da espessura em função da região capsular não é tão evidente em espécies com lentes com menor poder acomodativo (como o rato ou vaca). A espessura da região equatorial e pólo capsular anterior é 5-10x superior à espessura do pólo capsular posterior. Por exemplo, o saco capsular de um cristalino humano adulto no pólo anterior mede entre 25 a 30 μm , enquanto que o pólo capsular posterior mede apenas entre 2 a 4 μm ^{8,12}. Comparando com outras membranas basais humanas, a espessura da cápsula do cristalino é exponencialmente superior. Exemplificando, as membranas basais dos capilares humanos e glomérulos medem 0,1 μm e 0,3 μm , respetivamente ¹¹.

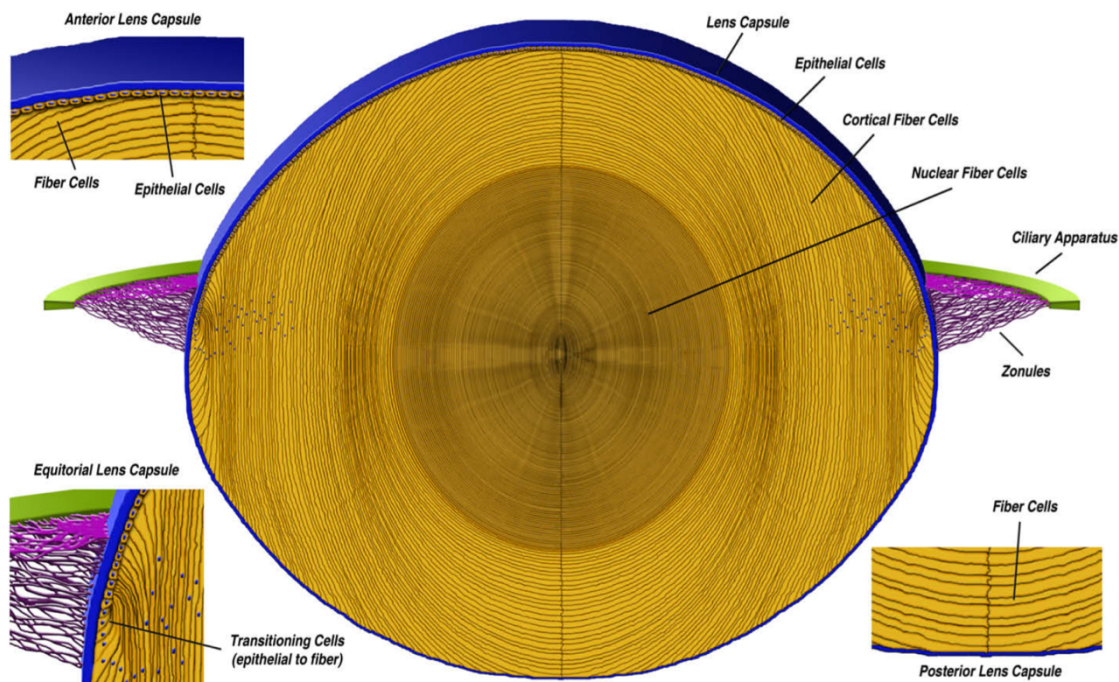


Figura 1 - No corte sagital apresentado, podemos identificar o saco capsular (a azul), as fibras lenticulares do cristalino (a amarelo) e, na região equatorial, o local de inserção das fibras zonulares (a roxo).

2.2 Congelamento da cápsula anterior do cristalino

Entenda-se por congelamento o processo em que organelos, células, tecidos ou mesmo órgãos, suscetíveis de sofrer danos resultantes de atividade enzimática desregulada, são preservados a temperaturas criogénicas, possibilitando a sua restauração funcional da estrutura, após descongelamento. A temperaturas suficientemente baixas, a atividade enzimática, passível de lesar o material biológico, cessa. No entanto, durante o processo de congelamento, as amostras biológicas estão sujeitas a sofrer danos devido à formação de cristais de gelo. Deste modo, até prova em contrário, para um dado tecido, o congelamento acarreta consequências estruturais e funcionais para o mesmo ^{6,13}. Paradoxalmente, como atrás referido, o tecido que se pretende preservar está sujeito a sofrer danos através do processo de preservação. Com o objetivo de os minimizar, é importante conhecer os mecanismos pelo qual o processo de congelamento altera as amostras a preservar. De seguida, é apresentada uma descrição de alguns mecanismos descritos para a lesão induzida pelo processo de congelamento das amostras.

Em primeiro lugar, verifica-se um aumento do fluído extracelular, como resultado da desidratação celular, induzida pelas baixas temperaturas ⁶. Deste modo, as células diminuem de tamanho, enquanto os cristais de gelo se vão formando no meio extracelular. À medida que se formam, os cristais de gelo extracelulares também provocam dano mecânico às células, que se deformam ¹⁴. Por outro lado, a conservação de estruturas contendo colagénio influencia a sua actividade biológica. Durante o processo de congelamento, a acção de proteinases, desnaturação proteica e modificação covalente das cadeias de aminoácidos ameaçam a integridade do colagénio capsular ¹⁵.

Paralelamente, o ritmo a que o congelamento e descongelamento ocorrem é que determina, essencialmente, a intensidade com que estes danos se farão sentir nas amostras, como demonstrado para amostras de córneas humanas ¹⁶. É relevante também notar que o ritmo “ideal” para cada amostra varia de tecido para tecido. Mais especificamente, ritmos elevados de congelamento podem ser adequados para preservar eritrócitos, por exemplo, mas estão associados a uma grande formação de cristais de gelo intracelular em outros tecidos ¹³. Em relação ao saco capsular do cristalino, ritmos mais baixos de congelamento (-1°C/min) têm sido utilizados para preservar as amostras, com efeito discreto nas propriedades biomecânicas do saco capsular do cristalino ¹⁷. Em relação aos efeitos do congelamento na espessura da cápsula do cristalino, descritos por Krag et al, é documentado um ligeiro aumento, de 2,7 +/- 0,7 nanómetros ¹⁷.

Frequentemente, é necessário proceder ao congelamento de amostras capsulares como meio de preservação das mesmas ³. O congelamento permite a conservação do saco capsular do cristalino para posterior avaliação das suas propriedades biomecânicas em testes de alongamento uniaxiais ¹⁷. Krag & Andreassen concluem que o congelamento, a -80°C, constitui um meio aceitável para a conservação desta membrana basal, apesar de uma ligeira redução do módulo de elasticidade de Young (provavelmente, de acordo com os autores, devido a um aumento da hidratação do tecido). Contudo, a metodologia utilizada para avaliação das propriedades biomecânicas do saco capsular do cristalino, neste trabalho, inclui o alongamento de dois pontos opostos de anéis obtidos a partir do mesmo (teste uniaxial). Esses autores desenvolveram, assim, um protocolo que permitiu a avaliação do comportamento ténisil e de relaxamento do saco capsular anterior a uma macro escala, enquanto que o protocolo que é sugerido, neste estudo-piloto, utiliza a MFA para avaliação do módulo

de elasticidade de Young das amostras capsulares. Finalmente, a quantificação deste módulo, permite a comparação das duas amostras.

2.3 Propriedades biomecânicas da cápsula anterior do cristalino

O comportamento viscoelástico da cápsula anterior do cristalino já foi estudado previamente ^{2,3,7,18,19}. Não obstante, as metodologias que têm vindo a ser propostas diferem bastante entre si. Desde estudos multiaxiais, a estudos em que a carga é aplicada em uma direção apenas (estudos uniaxiais), as propriedades biomecânicas do saco capsular do cristalino têm sido alvo de interesse ¹¹. A heterogeneidade dos métodos propostos dificulta a comparação entre resultados. No entanto, Hugar *et al* comparam as propriedades mecânicas desta peculiar membrana basal (Tabela 1) ²⁰.

A MFA, desenvolvida por Gerd Binnig e Heinrich Rohner, em 1986, rapidamente ganhou popularidade para o estudo de amostras biológicas ²¹. Esta técnica permite a visualização tridimensional de amostras biológicas através da passagem de uma ponta, associada a um cantilever metálico, que é utilizada para

Módulo de elasticidade de Young	Rigidez	Autores/Notas
300-2300 kPa		Krag et al. (2003)
20.1-131 kPa		Ziebarth et al. (2011)/MFA
	2.40 MPa	Danielsen (2004)
	4.4-44.8 MPa	Krag et al (2003)
	0.7-2 MPa	Van Alphen et al (1991)
	1.5-17.5 MPa	Krag et al (1997)

Tabela 1 – Propriedades mecânicas de amostras de cápsulas anteriores do cristalino humano. Repare-se na heterogeneidade de resultados obtidos. Adaptado de Hugar et al (2013).

mapear a amostra, não a danificando. A ponta nanométrica, aplicando uma força pré-programada, induz uma dada indentação na amostra, sendo o cantilever deformado e essa deformação é detetada por um laser díodo (Figura 2).

A indentação induzida é detetada num sistema computacional, dando origem a curvas de força-indentação. O módulo de elasticidade de Young é calculado através do declive das curvas de força-indentação obtidas. Não só a MFA é útil para a caracterização da microestrutura de amostras biológicas, como também pode ser utilizada para determinar propriedades mecânicas das mesmas, com limite de resolução

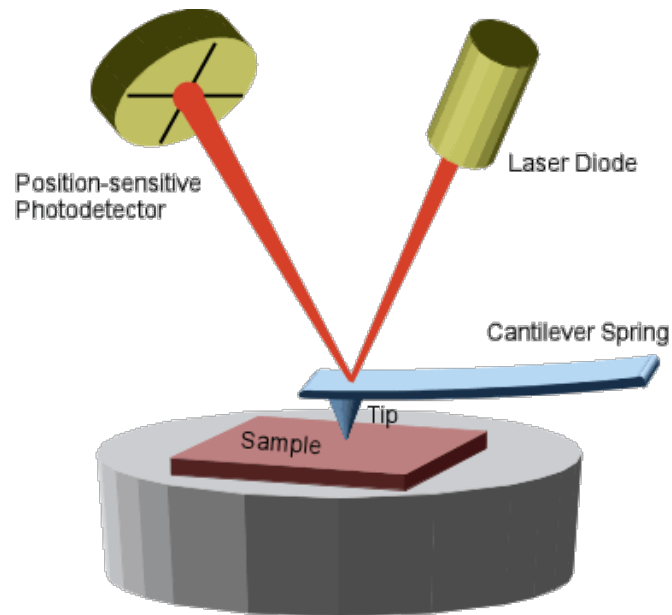


Figura 2 – Representação esquemática do funcionamento do Microscópio de Força Atômica: O laser diodo permite a deteção da deformação do cantilever, induzida pela topografia da amostra.

a um nível nanométrico. Particularmente, poucos autores utilizaram esta técnica na avaliação de propriedades mecânicas de amostras capsulares de tecidos humanos. Ziebarth et al avaliaram a elasticidade da cápsula anterior utilizando esta técnica^{22,23}. Os autores para além de concluírem que o módulo de elasticidade de Young aumenta significativamente com a idade, também propõem que o aumento da rigidez das amostras capsulares, verificado a uma nanoescala, seja um dos responsáveis pelo aumento da rigidez global das mesmas. Desde a validação deste método de microscopia para avaliação de propriedades do saco capsular anterior do cristalino, seguiram-se outros grupos de autores que, recorrendo à MFA, estudaram tão peculiar membrana basal^{10,24,25}.

3. Metodologia

Com o intuito de determinar o impacto do congelamento na elasticidade da cápsula anterior do cristalino, foi desenvolvida a seguinte metodologia:

3.1 Obtenção e preparação das amostras

As cápsulas anteriores do cristalino podem ser obtidas cirurgicamente, através de CCC, em doentes submetidos a cirurgia de catarata. Uma das amostras é congelada, enquanto a outra será designada como grupo-controlo (amostra fresca). A amostra é descongelada numa placa de Petri em contacto com uma placa a 50°C, durante 30 minutos. Relativamente à amostra fresca, esta pode ser transportada em recipientes contendo BSS, a temperatura ambiente. As amostras são embebidas numa solução de tripsina e EDTA, com o intuito de remover CEC que aderem à superfície posterior do saco capsular anterior do cristalino, após a CCC. As CEC, se não removidas quimicamente, podem prejudicar a avaliação da elasticidade da amostra^{23,26}. De seguida, as amostras são hidratadas com uma solução de DMEM. Por fim, as amostras são colocadas sobre um polímero de poli-L-lisina, servindo de substrato para a avaliação biomecânica das mesmas. Este polímero permite a adesão da amostra à lâmina, reduzindo a possibilidade de artefactos induzidos pelo cantilever.

3.2 Microscópio de Força Atómica

A MFA, em modo-contato, permitiu a avaliação da elasticidade das amostras através de curvas de força-indentação obtidas. A ponta do cantilever ($k=0.16$ N/m; $f_0=22$ kHz; raio da ponta 30 nm; ângulo cónico total 35°; série Olympus TR800PB) do Microscópio de Força Atómica (Asylum Research MFP-3D Standalone) foi baixada em direção à amostra usando um mecanismo piezoelétrico. O cantilever associado deforma-se e indenta a amostra de acordo com a rigidez da mesma. De uma maneira geral, quanto maior a rigidez, maior a deformação do cantilever e menor a indentação. Paralelamente, a força aplicada sobre a amostra é diretamente proporcional à indentação da amostra capsular. A força máxima de indentação foi de 5 nN, correspondendo a 0,5-2 μ m, aproximadamente, dependendo da rigidez da amostra. Os registos da elasticidade capsular foram repetidos pelo menos 5 vezes para cada amostra. O modelo utilizado para determinação do Módulo de elasticidade de Young foi o de Oliver-Pharr, atendendo ao fato do Fator de plasticidade das amostras ser superior a 0,10²⁷.

Particularmente à cápsula anterior do cristalino, este modelo tem vindo a ser proposto como o mais adequado para calcular o Módulo de elasticidade de Young a partir das curvas de força-indentação obtidas ^{9,10}. A avaliação biomecânica foi realizada a temperatura ambiente.

4. Estudo-Piloto

4.1 Introdução

Com o objetivo de validar a metodologia proposta, foi desenvolvido um estudo-piloto, onde se incluíram duas amostras.

4.2 Materiais e Métodos

A amostra, posteriormente congelada, foi obtida no HSM-CHLN e, de seguida, transportada em recipientes próprios para pequenas amostras para o Biobanco-IMM. Nesse local, a amostra capsular ficou conservada, a -80°C, durante aproximadamente dois meses, até ao dia da avaliação biomecânica, que decorreu nas instalações do Departamento de Física da FCT-UNL. A amostra fresca (controlo) foi obtida no próprio dia da avaliação biomecânica, no Hospital da Luz. Os doentes não sofriam de outra patologia que não a catarata, nomeadamente PEX. Não só consentimentos informados foram obtidos, como o protocolo a validar foi aprovado pela Comissão de Ética do HSM-CHLN.

4.3 Resultados

A idade dos doentes incluídos no estudo-piloto foi similar: a amostra fresca foi obtida num doente de 67 anos e a amostra que foi congelada foi proveniente de um de 63 anos, ambos submetidos a cirurgia de catarata por facoemulsificação.

A partir das curvas de força-indentação geradas foi calculado um módulo de elasticidade de Young de 154,73 kPa, na amostra fresca; comparativamente à amostra descongelada, em que o módulo de elasticidade de Young foi de 132,23 kPa. Constatou-se assim uma diferença de aproximadamente 14% entre as amostras.

4.4 Discussão

Neste estudo-piloto, a elasticidade de duas amostras de cápsulas anteriores do cristalino foi avaliada quantitativamente, após remoção química das CEC, recorrendo-se a MFA.

Relativamente à ordem de grandeza dos resultados obtidos, constata-se que os valores são cerca de 100 vezes inferiores aos publicados por investigadores precedentes^{1,3,8,18,19}. Por outro lado, os resultados obtidos assemelham-se aos que Ziebarth et al. publicaram²³. Este último grupo de autores também utilizou MFA para avaliação da elasticidade das amostras, o que suporta que a diferença na ordem de grandeza dos valores publicados se deva à metodologia utilizada. A semelhança verificada nos valores obtidos com o último grupo de autores valida, de certa forma, o protocolo para remoção de CEC com uma solução de EDTA e tripsina.

Relativamente aos efeitos do congelamento na elasticidade das amostras, verificou-se diminuição do módulo de elasticidade de Young, sugerindo uma diminuição na rigidez da amostra descongelada. Este resultado não é, na verdade, surpreendente, uma vez que vai de encontro ao concluído por Krag et al. que verificaram a mesma diminuição, mas com uma metodologia de avaliação biomecânica totalmente distinta, como explicado anteriormente¹⁷. É especulado que o congelamento e posterior descongelamento aumentem a hidratação da amostra.

Em suma, os resultados obtidos, através de MFA, são comparáveis aos observados na literatura, apontando para a viabilidade deste método de Microscopia para estudo da elasticidade de amostras de cápsulas anteriores do cristalino. Para além disso, em relação aos efeitos do congelamento na elasticidade de amostras capsulares, verificou-se uma diminuição do módulo de elasticidade de Young na amostra descongelada, comparativamente à amostra fresca. Finalmente, não posso deixar de ressaltar a necessidade de estudos posteriores, com a inclusão de um maior número de amostras, de forma a se obterem resultados estatisticamente significativos, que permitam uma melhor comparação dos efeitos do congelamento, à nanoescala, desta importante membrana basal. Não obstante, a metodologia proposta é passível de vir a ser utilizada para investigação biomecânica de amostras capsulares, através da criação de um banco de amostras de cápsulas anteriores do cristalino, com aplicações na compreensão tanto da presbiopia, como das subluxações do complexo lente-saco intraocular.

5. Agradecimentos

Um muito obrigado ao Professor Doutor Carlos Neves por me ter acolhido no Serviço de Oftalmologia do Hospital Santa Maria, sem o qual não teria sido possível este trabalho.

À minha orientadora e mentora, Professora Doutora Filomena Ribeiro, fonte de todo o entusiasmo e inspiração que geraram este trabalho.

Ao Biobanco - Instituto Medicina Molecular, pela ajuda e ensinamentos prestados.

Ao Tomás Calmeiro, da Faculdade Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, que me esclareceu inúmeras dúvidas ao longo deste percurso.

Ao Dr. Bernardo Feijóo, pela inesgotável disponibilidade e imprescindíveis comentários e incentivo ao longo deste caminho.

A todos que, em casa, sempre me foram ajudando com uma imensa paciência, apoio e esperança de trabalho chegado ao fim.

Aos doentes, fim último de tudo o que me motivou.

6. Bibliografia

1. Pedrigi RM, Dziezyc J, Humphrey JD. Altered mechanical behavior and properties of the human anterior lens capsule after cataract surgery. *Exp Eye Res.* 2009;89(4):575-580. doi:10.1016/j.exer.2009.06.001.
2. Pedrigi RM, David G, Dziezyc J, Humphrey JD. Regional mechanical properties and stress analysis of the human anterior lens capsule. *Vision Res.* 2007;47(13):1781-1789. doi:10.1016/j.visres.2007.03.014.
3. Krag S, Olsen T, Andreassen TT. Biomechanical characteristics of the human anterior lens capsule in relation to age. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38(2):357-363. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040468>.
4. Schachar R a. The mechanism of accommodation and presbyopia. *Int Ophthalmol Clin.* 2006;46(3):39-61. doi:10.1097/00004397-200604630-00006.
5. Ziebarth NM, Borja D, Arrieta E, et al. Role of the lens capsule on the mechanical accommodative response in a lens stretcher. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(10):4490-4496. doi:10.1167/iovs.07-1647.
6. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1984;247(3):C125-142. <http://ajpcell.physiology.org/content/247/3/C125>.
7. Fisher RF. Elastic constants of the human lens capsule. *J Physiol.* 1969;201(1):1-19. doi:10.1113/jphysiol.1971.sp009315.
8. Krag S, Andreassen TT. Mechanical properties of the human lens capsule. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(6):749-767. doi:10.1016/S1350-9462(03)00063-6.
9. Burd HJ. A structural constitutive model for the human lens capsule. *Biomech Model Mechanobiol.* 2009;8(3):217-231. doi:10.1007/s10237-008-0130-5.
10. Choi S, Lee HJ, Cheong Y, et al. AFM study for morphological characteristics and biomechanical properties of human cataract anterior lens capsules. *Scanning.* 2012;34(4):247-256. doi:10.1002/sca.21001.
11. Danysh BP, Duncan MK. The lens capsule. *Exp Eye Res.* 2009;88(2):151-164. doi:10.1016/j.exer.2008.08.002.

12. Barraquer RI, Michael R, Abreu R, Lamarca J, Tresserra F. Human lens capsule thickness as a function of age and location along the sagittal lens perimeter. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):2053-2060. doi:10.1167/iovs.05-1002.
13. Krag S, Andreassen TT. Effect of freezing on lens capsule mechanical behavior. *Ophthalmic Res*. 1998;30(5):280-285.
14. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*. 2000;41(4):187-196. doi:10.1093/ilar.41.4.187.
15. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. 2009;(September):119-126.
16. Lee SL. Optimal conditions for long term storage of native collagens. *Coll Relat Res*. 1983;3:305-315. doi:10.1016/S0174-173X(83)80012-0.
17. Young RD, Armitage WJ, Bowerman P, Cook SD, Easty DL. Improved preservation of human corneal basement membrane following freezing of donor tissue for epikeratophakia. 1994:863-870.
18. Van Alphen GWHM, Graebel WP. Elasticity of tissues involved in accommodation. *Vision Res*. 1991;31(7-8):1417-1438. doi:10.1016/0042-6989(91)90061-9.
19. Danielsen CC. Tensile mechanical and creep properties of Descemet's membrane and lens capsule. *Exp Eye Res*. 2004;79(3):343-350. doi:10.1016/j.exer.2004.05.014.
20. Hugar DL, Ivanisevic A. Materials characterization and mechanobiology of the eye. *Mater Sci Eng C*. 2013;33(4):1867-1875. doi:10.1016/j.msec.2013.02.009.
21. Allison DP, Mortensen NP, Sullivan CJ, Doktycz MJ. Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2010;2(6):618-634. doi:10.1002/wnan.104.
22. Ziebarth NM, Wojcikiewicz EP, Manns F, Moy VT, Parel J-M. Atomic force microscopy measurements of lens elasticity in monkey eyes. *Mol Vis*. 2007;13(April):504-510. doi:v13/a54 [pii].

23. Ziebarth NM, Arrieta E, Feuer WJ, Moy VT, Manns F, Parel JM. Primate lens capsule elasticity assessed using Atomic Force Microscopy. *Exp Eye Res.* 2011;92(6):490-494. doi:10.1016/j.exer.2011.03.008.
24. Tsaousis KT, Karagiannidis PG, Kopsachilis N, et al. Measurements of elastic modulus for human anterior lens capsule with atomic force microscopy: The effect of loading force. *Int Ophthalmol.* 2014;34(3):519-523. doi:10.1007/s10792-013-9846-z.
25. Sueiras VM, Moy VT, Ziebarth NM. Lens capsule structure assessed with atomic force microscopy. *Mol Vis.* 2015;21(July 2014):316-323.
26. Humphry RC, Davies EG, Jacob TJ, Thompson GM. The human anterior lens capsule--an attempted chemical debridement of epithelial cells by ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) and trypsin. *Br J Ophthalmol.* 1988;72(6):406-408.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1041470&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
27. Oliver WC, Pharr GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *J Mater Res.* 1992;7(6):1564-1583. doi:10.1557/JMR.1992.1564.

Lista de figuras e tabelas

Figura 1 - No corte sagital apresentado, podemos identificar o saco capsular (a azul), as fibras lenticulares do cristalino (a amarelo) e, na região equatorial, o local de inserção das fibras zonulares (a roxo). Retirado de Danysh & Duncan 2009.

Figura 2 - Representação esquemática do funcionamento do Microscópio de Força Atômica: O laser díodo permite a detecção da deformação do cantilever, induzida pela topografia da amostra. Retirado de <https://undergrad.research.ucsb.edu/2014/03/atomic-force-microscope-tiny-record-player/>

Tabela 1 – Propriedades mecânicas de amostras de cápsulas anteriores do cristalino humano. Repare-se na heterogeneidade de resultados obtidos. Adaptado de Hugar et al (2013).